

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на тему «**Фармацевтическое обоснование получения фитосубстанции из растительного сырья Хатьмы Тюрингенской (*Lavatera thuringiaca* L.)**» на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D074800 - «Технология фармацевтического производства»
Жандабаевой Молдир Алибековны

Актуальность темы исследования

Национальный проект «Здоровая нация» качественное и доступное здравоохранение для каждого гражданина»» направлен на развитие отечественного производства лекарственных средств и медицинских изделий по потенциалу развития фарминдустрии Казахстана. Одной из основных задач проекта является прорыв в производстве отечественных лекарственных средств и медицинских изделий, обеспечение их достаточного запаса и расширение номенклатуры. Казахский народ должен иметь свободный доступ к качественной медицинской продукции.

Кроме того, на сегодняшний день вступил в силу комплексный план по развитию фармацевтической и медицинской промышленности на 2020-2025 годы. Президент РК в послании на 2022 год «Единство народа и системные реформы – мощная основа процветания страны» отметил необходимость доведения доли лекарственных средств и медицинских изделий отечественного производства к 2025 году до 17-50%. Одной из основных задач комплексного плана является проработка вопросов развития биологически активных веществ растительного происхождения и иных препаратов в отечественных предприятиях, и повышение их конкурентоспособности.

По прогнозам Всемирной организации здравоохранения, за последние десять лет доля лекарственных препаратов растительного происхождения в общем объеме лекарственных препаратов составит более 60%. Поэтому в настоящее время доля лекарственных препаратов растительного происхождения на мировом рынке увеличивается. Во всем мире значительно возросли интересы населения к лекарственным препаратам растительного происхождения по сравнению с синтетическими лекарственными препаратами в связи с более мягким действием, меньшей зависимостью и отсутствием побочных эффектов.

Развитие технологии фармацевтического производства в Республике Казахстан является целенаправленным и стратегически эффективным путем развития производства лекарственных препаратов на растительной основе, что обусловлено уникальным запасом лекарственного растительного сырья на территории государства, значительным научно-техническим потенциалом в области производства новых лекарственных препаратов из растительного сырья. Исходя из этого, одной из основных приоритетных задач на пути развития отечественной фармацевтической промышленности является поиск новых

источников лекарственных средств, разработка оригинальных отечественных фармацевтических субстанций и внедрение в практику лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья.

Хатьма Тюрингенская (*Lavatera thuringiaca* L.) представляет практический интерес в качестве перспективного лекарственного растения, богатого биологически активными веществами. По результатам аналитического обзора литературы лекарственное растение Хатьма тюрингенская в Казахстане систематически не изучалось. Хатьма тюрингенская широко распространен в всех регионах Республики Казахстан. Хатьма Тюрингенская - относятся к роду Хатьма семейства Мальвовые. Единственный вид этого семейства - Хатьма Тюрингенская, который растет в степях, на пастбищах, в лесах, на обочинах дорог, на побережье рек, озер и всех регионов Казахстана [1].

Хатьма Тюрингенская, является лекарственным растением, широко используемым в народной медицине, при простуде, кашле, диарее и некоторых других заболеваниях желудочно-кишечного тракта.

Хатьма Тюрингенская, является лекарственным растением, обладающим противовоспалительными, противомикробными и другими фармакологическими свойствами [2].

Лечебные свойства Хатьмы Тюрингенской обусловлены ее химическим составом. В составе содержатся слизь (17,37%), полисахариды (9%), жирные кислоты (15,8%), алкалоиды, флавоноиды, фосфолипиды, фенолипиды, конденсированные и гидролизуемые дубильные вещества, кумарины, эти соединения свидетельствуют о целесообразности изучения и внедрения данного сырья в научную медицину.

Российскими учеными, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, были определены фенольные соединения, содержащиеся в корневищах, траве, стебле, листьях, цветках растительного сырья Хатьмы Тюрингенской. Кроме того, был изучен состав флавоноидов и фенолокислот в цветках Хатьмы Тюрингенской, произрастающей в Польше. Установлено, что в корнях растительного сырья содержится не менее 9% суммы водорастворимых полисахаридов и не менее 3% суммы моносахаридов, в том числе восстанавливающих сахаров. Полностью изучены фенольные соединения, флавоноиды и полисахариды в составе растительного сырья Хатьмы Тюрингенской. Pavle Z. Mašković и другими сербскими учеными были получены экстракты методами Сокслета, мацерации, ультразвука, микроволновой и экстракцией субкритической водой и исследованы их антимикробное, цитотоксическое, антиоксидантное действие. Химические компоненты этих экстрактов были определены методом ВЭЖХ-ДАД. При определении компонентного состава экстрактов, полученных зарубежными учеными, класс терпенов не выявлен.

В связи с этим, впервые в нашем исследовании был получен СО₂-экстракт в докритических условиях из надземной части Хатьмы Тюрингенской и исследован ее компонентный состав, в котором определены соединения класса

терпенов, а также определена антимикробная активность против патогенных бактерий. Методом ВЭЖХ флавоноиды в составе экстракта из растительного сырья не выявлены. При исследовании компонентного состава фармацевтической субстанции методом ГХ/МС были идентифицированы насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, терпены и их производные, производные кумарина и др. биологически активные вещества.

Поэтому, изучение химического состава лекарственного растительного сырья Хатьмы Тюрингенской, выбор и стандартизация эффективных технологических аспектов получения экстрактов из растительного сырья и оптимальных методов поиска биологически активных соединений в их составе является актуальной проблемой.

Цель научно-исследовательской работы: поиск основных биологически активных веществ в составе лекарственного растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L., разработка и стандартизация технологии полученной фармацевтической субстанции.

Объекты исследования: *Lavatera thuringiaca* L., произрастающая на территории Казахстана и экстракты, полученные методами мацерации, перколяции, CO₂ экстракции в докритических и сверхкритических условиях.

Предмет исследования: согласно данным научной литературы, проведение анализа ареала произрастания, химического состава, применения в официальной и народной медицине и фармакологических свойств объекта исследования лекарственного растения Хатьма Тюрингенская; на этой основе определение целей и задач научного исследования, определение фармакогностических особенностей растительного сырья Хатьмы Тюрингенской, стандартизация лекарственного растительного сырья, получение оптимальной технологии экстрактов и изучение их химического состава и фармакологических свойств, разработка нормативных документов, сбор итоговых материалов, определяющих теоретическую и практическую ценность диссертации.

Задачи исследовательской работы:

- Сбор растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L. и исследование технологии заготовки и ареала его распространения;
- Фармакогностический анализ лекарственного растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L.;
- Изучение фармацевтико-технологических параметров лекарственного растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L.;
- Оптимальная технология получения экстракта из растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L. и его стандартизация;
- Изучение безопасности и фармакологической активности фитосубстанции из *Lavatera thuringiaca* L.;

Научна новизна исследования:

Впервые в Казахстане проведен фармакогностический анализ лекарственного растительного сырья Хатьма Тюрингенская: макро- и микроскопический анализ, товароведческий анализ, фитохимический анализ. Для сравнительного изучения химического состава лекарственного растительного сырья были получены густые экстракты методами мацерации, перколяции, докритической и сверхкритической углекислотной экстракции, а их химический состав определен методом газовой хроматографии с использованием масс-спектрометрического детектора. В результате в качестве оптимальной технологии получения экстракта из растительного сырья Хатьмы Тюрингенской, был выбран метод углекислотной экстракции в докритических условиях, в ходе исследования ее фитохимического состава было выявлено свыше 40 химических соединений. Была доказана антимикробная активность против тест-штаммов *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Str. Pneumonia*, *K. pneumonia*, *S. haemolyticus*, *S. Saprophyticu*, а также противовоспалительная и антиоксидантная эффективности.

Научная новизна исследования подтверждена патентом под регистрационным номером №35059 (Способ получения углекислотного экстракта из травы Хатьмы Тюрингенской (*Lavatera thuringiaca* L.).

Основные положения диссертационного исследования, выносимые на защиту:

- Результаты изучения ареала распространения, разработка технологии заготовки сырья, определения фармакогностических особенностей и фармацевтико-технологических параметров растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L. и его стандартизация.
- Результаты исследований по выбору оптимальной технологии получения экстракта из сырья *Lavatera thuringiaca* L., определения его компонентного состава и стандартизации, оценка его безопасности и фармакологической активности.

Практическая значимость полученных результатов

Разработаны проекты нормативных документов на растительное сырье Хатьма Тюрингенская и экстракты на ее основе, апробированы и внедрены методы анализа:

- Представлена технология сбора и подготовки растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L. Идентификация лекарственного растительного сырья подтверждена Государственным учреждением Республики Казахстан «Институт ботаники и фитоинтродукции». Регистрационный номер справки № 01-08/273 (Приложение № Б).

- По практическому применению технологии сбора и заготовки растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L. представлен Акт внедрения в ТОО «Зерде-Фито» (Приложение № В).

- Предложен Акт внедрения по «Способу получения густого углекислотного экстракта из надземной части растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L.» в ТОО «ПЛП Жанафарм» (Приложение № Г).

- Представлен проект технологической инструкции на «Способ получения густого углекислого экстракта из надземной части растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L.» в ТОО «ПЛП Жанафарм» (Приложение № Д).

- Представлен акт внедрения технологического процесса получения экстракта методом перколяции из растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L. на кафедре фармацевтической технологии НАО «Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова» (Приложение № Е).

- Представлен акт внедрения технологического процесса получения экстракта методом мацерации из растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L. на кафедре фармацевтической технологии НАО «Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова» (Приложение № Ж).

- Выполнена научной стажировки в рамках докторской диссертации в ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет.

- Предложен Стандарт организации на «Способ получения густого углекислого экстракта из надземной части растительного сырья *Lavatera thuringiaca* L.» в ТОО «ПЛП Жанафарм» (Приложение № М).

- Разработан проект нормативных документов на «СО₂ экстракт в докритических условиях травы Хатьмы Тюрингенской» в ТОО «ПЛП Жанафарм» (Приложение № Н).

Личный вклад докторанта

Докторантом самостоятельно проведен обзор и анализ информации отечественных и зарубежных стран по теме диссертационной работы, выполнены все экспериментальные работы по поставленным исследовательским задачам. Все полученные результаты исследований подтверждаются использованием современных методов анализа и оборудований в научных центрах и лабораториях.

Достоверность и обоснованность результатов по исследованиям подтверждается тем, что выполненные работы предназначены для решения актуальной на сегодняшний день проблемы, выполнены в ведущих современных исследовательских центрах мирового уровня и проектом нормативных документов.

Апробация результатов диссертации:

Результаты выполненных исследовательских работ по теме диссертации представлены в материалах Международной научной конференции «Современные аспекты медицины и фармации: образование, наука и практика,

посвященной 40-летию Южно-Казахстанской медицинской академии» (Шымкент, 2019 г.); в материалах XXXVII Международной научно-практической конференции (г. Пенза, 2020 г.) «Фундаментальные и прикладные научные исследования: Актуальные вопросы, достижения и инновации»; в трудах III Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора Р. Дильбарханова «Становление и перспективы развития научной Школы фармации: преемственность поколений» (Алматы, 2020 г.); в материалах IX Международной конференции «Издательства фармации и стоматологии: от теории к практике», посвященной памяти профессора Кияшева Д. К. в рамках 90-летия Казахского национального медицинского университета им. С.Д. Асфендиярова (Алматы, 2020 г.); в материалах III Международного книжного издания стран Содружества Независимых Государств «Лучший молодой ученый - 2021» (Нур-султан, 2021 г.). Докладывались на кафедре Инженерных дисциплин Школы фармации НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова» (Алматы, 2021 г.); на заседании Научной комиссии «Фармации» НАО «Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова» (Алматы, 2021 г.).

Публикации

Результаты диссертационного исследования были опубликованы в 14 научных работах, в том числе: 1 публикация в международном журнале, входящий в базу данных Scopus, 4 публикации в журналах, рекомендованных КОКСОН МОН РК, 6 публикации в материалах Международных научно-практических конференции, 1 публикация в базе РИНЦ, 1 публикация в издательстве «Лучший молодой ученый - 2021», 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации: Диссертационная работа изложена на 170 страницах машинописного текста в компьютерном наборе, содержит 61 таблиц, 64 рисунков, список литературы, включающий 128 источников, а также 12 приложений. Работа состоит из введения, обзора литературы, раздела, посвященного материалам и методам исследования, трех разделов собственных исследований, выводов и заключения.

Заключение

1. Дикорастущее растительное сырье Хатьма Тюрингенская было собрано в летний период в фазе цветения в соответствии с требованиями GACP. Траву сушили в специальном помещении Института ботаники и фитоинтродукции при комнатной температуре $25 \pm 5^\circ\text{C}$. Было проконтролировано, что собранное сырье не содержит твердых частиц почвы, грязи, пыли, насекомых. Сырье помещали в мешки из крафт-бумаги по 10 кг с указанием наименования сырья, места заготовки, времени сбора и массы нетто. Изучение анатомо-морфологических особенностей сырья Хатьма Тюрингенская, выявило следующие диагностические признаки: при осмотре с обеих сторон листовой пластинки эпидермальные клетки имеют прямые или слегка изогнутые стенки. Видны

стомальные аппараты аномоцитного типа. В эпидермисе много звездчатых волосков. Верхний эпидермис состоит из простых одноклеточных волосков и слизистых идиобластов. Главная жилка в поперечном сечении имеет круглую треугольную форму. В главной жилке обе стороны эпидермальной клетки имеют удлиненную форму с вертикальными стенками. Вдоль жилки волоски звездообразной формы. Во флоэме и вокруг паренхимы содержится большое количество оксалата кальция.

2. Идентификация образцов растительного сырья Хатьмы Тюрингенской проводилась по следующим параметрам: макро- и микроскопические особенности сырья, качественный и количественный состав БАВ. Качественное и количественное исследование выявило наличие флавоноидов, аминокислот, алкалоидов, полисахаридов, гидролизированных и конденсированных дубильных веществ, эфирных масел (терпены), фенольных кислот, иридоидов, кумаринов и сапонинов.

Согласно приказу Министра Здравохранения Республики Казахстан № ҚР ДСМ-20 от 16 февраля 2021 года определены показатели качества растительного сырья Хатьма Тюрингенская и разработана спецификация качества.

Согласно приказу от 28 октября 2020 года результаты, полученные в течение длительного периода исследований сырья Хатьма Тюрингенская, позволяют установить температуру $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, показатель относительной влажности $60\pm 5\%$, и срок хранения 2 года.

3. Определены технологические параметры растительного сырья Хатьмы Тюрингенской: удельная, объемная и насыпная масса, пористость, порозность, свободный объем слоя сырья, коэффициент поглощения экстрагента, экстрактивные вещества.

На основе растительного сырья были получены экстракты традиционными и современными методами экстракции. Использованы классические методы: мацерация, перколяция; современные методы: углекислотная CO_2 экстракция в сверхкритических и докритических условиях. В качестве оптимального экстракта был выбран углекислотный экстракт, полученный в докритических условиях и были определены параметры его экстрагирования. Оптимальные условия получения докритического углекислотного экстракта: время экстракции 11 часов, давление 45-51 атм, скорость потока экстрагента через сырье 5-10 $\text{cm}^3/\text{ч}$, степень измельченности сырья 1-3 мм и температура $18-21^{\circ}\text{C}$.

Анализ химического состава экстрактов, полученные методами мацерации и перколяции, до- и сверхкритической углекислотной экстракцией, проводили методом газовой хроматографии (Agilent MSD ChemStation) с использованием масс-спектрометрического детектора. По результатам исследования основные соединения представлены в следующей таблице:

Таблица 1 - Сравнительный анализ химического состава экстрактов лекарственного растительного сырья Хатьма Тюрингенская.

Время удерж, мин.	Соединения	Мацерация		Перколяция		Докритический CO ₂ - экстракт, %	Сверхкритический CO ₂ - экстракт, %
		50%	70%	50%	70%		
12,8	N,N-Dimethylglycine	15,9	17,1	9,7	8,6	0,37	-
10,9	Pulegone	-	-	-	-	5,08	-
20,4	Phytol	9,12	6,39	5,6	12,2	2,49	-
25,7	Linoleic acid	7,56	8,42	13,2	7,1	6,95	-
26,7	Linolenic acid	26,9	21,3	20,1	23,6	9,38	-
17,6	Glycerin	4,32	4,36	5,7	3,0		-
11,2	cis-β-Farnesene	-	-	-	-	7,63	-
18,3	Coumaran	2,13	1,53	1,02	1,0	-	-
14,0	Berbenone	-	-	-	-	1,93	-
14,7	Caryophyllene oxide	-	-	-	-	1,35	-
40,6	Stigmasterol	2,6	-	-	-	-	-
24,0	γ-Sitosterol	15,2	-	-	-	-	-
25,0	Oleic Acid	2,31	2,15	1,23	1,6	10,7	-
16,1	1H-Cycloprop[e]azulen-7-ol, decahydro-1,1,7-trimethyl-4-methylene-	-	-	-	-	6,97	-
16,2	α-Bisabolol oxide B	-	-	-	-	9,65	-
16,9	α-Bisabolol	-	-	-	-	1,36	-
17,3	Palmitic acid, ethyl ester	-	-	6,0	8,0	2,72	-
18,7	Bisabolol oxide A	-	-	-	-	8,26	-
23,1	Herniarin	-	-	-	-	5,61	-
25,9	1-Eicosanol	3,52	-	-	-	-	-
24,3	Squalene	-	-	-	-	-	1,28
22,9	Nonacosane	-	-	-	-	-	77,40
29,5	Octacosanol	-	-	-	-	-	5,07
19,5	Heneicosane	-	-	-	-	-	3,83

По результатам исследования в качестве оптимального метода извлечения БАВ была выбрана углекислотная экстракция в докритических условиях.

4. Разработана оптимальная технология получения углекислотного экстракта в докритических условиях: предложена технологическая схема производства, дано описание технологического процесса.

5. Определены показатели качества углекислотного экстракта на основе растительного сырья Хатьма Тюрингенская, согласно приказу Министра здравоохранения Республики Казахстан № ҚР ДСМ-20 от 16 февраля 2021 года: описание, идентификация, сухой остаток, потеря в массе при высушивании, тяжелые металлы, микробиологическая чистота, количественное определение, упаковка, маркировка, транспортировка, хранение, срок хранения, основное фармакологическое действие, время удерживания бисаболола - 18,7; количественное определение - 8,26%.

Полученные данные по долгосрочному испытанию углекислотного экстракта на основе растительного сырья Хатьма Тюрингенская, согласно приказу Министра здравоохранения Республики Казахстан № ҚР ДСМ -165/2020 от 28 октября 2020 г. показали, что при температуре $25\pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности $60\pm 5\%$, существенных изменений по результатам определения показателей качества не наблюдалось. Исследования по определению стабильности экстракта продолжаются.

6. Установлено, что углекислотный экстракт на основе растительного сырья Хатьмы Тюрингенской, является безопасным и не проявляет аллергических реакций. В результате исследования не наблюдалось аллергическая реакция на участке кожи, куда наносили масляный раствор углекислотного экстракта Хатьмы Тюрингенской.

По классификации Hodge, Sterner и К.К. Сидорова экстракт относится к группе практически нетоксичных соединений класса 5, $LD_{50} > 5000$ мг/кг.

Углекислый экстракт, на основе растительного сырья Хатьмы Тюрингенской, практически относится к группе нетоксичных лекарственных средств, поэтому доказана возможность рекомендации для проведения клинических исследований с целью представления в качестве субстанции для фармацевтического производства.

Экстракты на основе растительного сырья Хатьмы Тюрингенской, полученные методами мацерации, перколяции и углекислотной экстракции обладают выраженным антимикробным действием против клинически значимых микроорганизмов: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Streptococcus pneumonia* ATCC 660, *Klebsiella pneumonia* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Staphylococcus haemolyticus* и *Staphylococcus saprophyticus*.

Определение антиоксидантной активности экстрактов, полученные методами мацерации, перколяции и углекислотной экстракции из растительного сырья, проводили по изменению интенсивности хемилюминесценции на хемилюминометре ХЛ-003 на модельных системах (*in vitro*) в реакциях образования наиболее часто встречающихся в организме активных форм кислорода и реакциях свободнорадикального перекисного окисления липидов.

Противовоспалительный эффект углекислотного экстракта на основе растительного сырья Хатьмы Тюрингенской был проведен на модели с острым экссудативным воспалительным процессом, индуцированным инъекцией

каррагинана, для оценки воздействия экстрактов на систему циклооксигеназы у самцов крыс. Острые каррагинановые опухоли возникли в результате субплантического введения 0,1 мл 1% раствора каррагинана в апоневроз задних конечностей крыс.

Результаты анализа противовоспалительной активности углекислотного экстракта показали 7,5% в дозе 25 мг/кг, 13% в дозе 50 мг/кг, 16% в дозе 100 мг/кг углекислотного экстракта Хатьмы Тюрингенской, при этом в сравнительном препарате - 15%. Максимальная активность в полученных дозах составляла 100 мг / кг, т.е. 16%.

Оценка полноты поставленных задач

Сохраняя внутреннее единство диссертационной работы в полном объеме были выполнены исследования по поставленным задачам по определению ареала распространения растительного сырья Хатьма Тюрингенская, разработки соответствующей технологии заготовки сырья, фармакогностические особенности и результатам определения фармацевтико–технологических параметров и стандартизации; по выбору оптимальной технологии получения экстракта из растительного сырья, определению его компонентного состава и стандартизации, оценке безопасности и биологической активности.

Рекомендации и исходные данные для конкретного использования результатов

Определение ареала распространения растительного сырья Хатьма Тюрингенская, разработка соответствующей технологии заготовки сырья, фармакогностические особенности и результаты определения фармацевтико–технологических параметров и стандартизация; выбор эффективной технологии получения различных видов экстракта из Хатьмы Тюрингенской, определение его компонентного состава и стандартизация, определение безопасности и антиоксидантной, антимикробной и противовоспалительной свойств позволяют его рекомендовать отечественным фармацевтическим производствам в качестве фармацевтической субстанции.

Разработан проект нормативных документов на растительное сырье *Lavatera thuringiaca* L., и углекислый экстракт на его основе.

Оценка научного уровня выполненной работы в сравнении с лучшими достижениями в данной области

Полученные результаты по выполненной диссертационной работе подтверждены 1 патентом на изобретение, 4 статьями в журналах, рекомендованных КОКСОН МОН РК; 1 публикацией в международном журнале, входящим в базу данных Scopus «Determination of the chemical composition and antimicrobial activity of *Lavatera thuringiaca* L. medicinal herb material extracted under subcritical conditions by liquid carbon dioxide method». Кроме того, основные результаты исследований докладывались на Международных научно-практических конференциях (Казахстан, Россия).

Научно-методический уровень диссертационной работы в целом соответствует современным требованиям, предъявляемым к данной категории работ.